

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Оценка действия отдельных классов токсических веществ на активность
трипсина

03.03.02 - Физика

Руководитель _____ к.б.н., доцент, с.н.с. Е.Н. Есимбекова

Выпускник _____ А.А. Анташкевич

Красноярск 2019

Реферат

Бакалаврская работа «Оценка действия отдельных классов токсических веществ на активность трипсина» содержит 49 страниц текстового документа, 82 использованных источника, 9 рисунков, 1 таблицу.

Целью работы являлась оценка возможности применения трипсина в качестве маркера загрязнения окружающей среды токсическими веществами. Были определены закономерности действия различных классов токсических веществ, в том числе тяжелых металлов, пестицидов и хинонов на активность трипсина; подобраны условия проведения анализа, обеспечивающие максимальную чувствительность трипсина к выбранным классам веществ; разработана методика анализа загрязнения сред токсическими веществами.

Показано, что большая часть анализируемых веществ не оказывает существенного воздействия на активность трипсина, либо эффект проявляется в том случае, когда концентрация токсиканта существенно выше его ПДК. Введение дополнительной процедуры инкубации фермента в анализируемом растворе и уменьшение количества трипсина в реакционной смеси (до 5,53 мU) не позволило значительно увеличить чувствительность метода.

Несмотря на отсутствие чувствительности фермента к отдельным тяжелым металлам, пестицидам исследование освещает влияние на активность трипсина таких загрязнителей, которые ранее не рассматривались в качестве возможных ингибиторов или стимуляторов фермента, решая тем самым фундаментальную задачу.

АНАЛИЗ БЕЗОПАСНОСТИ СРЕДЫ, ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ, ПЕСТИЦИДЫ, ХИНОНЫ, КОНСЕРВАНТЫ, ТРИПСИН, СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ, ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ТЕСТЫ.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	1
ВВЕДЕНИЕ	4
Обзор литературы.....	6
1.1 Структура трипсина, механизм катализа и особенности функционирования.....	6
1.2 Тяжелые металлы: биологическая функция и токсическое действие.....	10
1.3 Пестициды: их характеристика и действие на биологические объекты.	16
1.4 Хиноны: биологическая роль и токсические эффекты.....	19
1.5 Характеристика отдельных консервантов	20
1.6 Принципы, преимущества и недостатки методов ферментативного тестирования.....	21
2 Материалы и методы исследования.....	24
2.1 Материалы и оборудование, используемые в работе	24
2.2 Методика определения активности трипсина	24
3 Оценка влияния разных классов токсических веществ на активность трипсина	26
3.1 Подбор условий проведения анализа содержания токсикантов.....	26
3.2 Анализ влияния растворителей на активность трипсина.....	27
3.3 Анализ чувствительности трипсина к действию тяжелых металлов.....	29
3.4 Анализ чувствительности трипсина к действию пестицидов.....	32
3.5 Анализ чувствительности трипсина к действию хинонов	34
3.6 Определение влияния консервантов на активность трипсина.....	35
3.7 Сравнение чувствительности трипсина к действию разных классов токсических веществ.....	36
Выводы	39
Заключение	40
Список использованных источников	41

ВВЕДЕНИЕ

Трипсин является одним из ключевых ферментов катаболизма белков, поэтому его правильное функционирование определяет здоровое состояние организма. На его гидролитическую активность влияют различные вещества, которые могут стимулировать или ингибировать его действие. К ингибиторам относятся, например, специфические ингибиторы протеаз из соевых бобов (KSTI и BBI), кадмий, и т.д. [35, 37, 3], к активаторам - изопропанол, путресцин, бензоат натрия [43, 32, 45]. При этом оба эффекта могут иметь пагубные последствия, поскольку трипсин играет ключевую роль в активации ферментов поджелудочной железы.

В настоящее время в окружающей среде, в воде и почве, которые используются человеком в сельскохозяйственной деятельности, особенно широко распространены тяжелые металлы [9, 33, 6] и пестициды [36, 25]. Предприятия целлюлозно-бумажной промышленности загрязняют окружающую среду фенолами, которые занимают одно из первых мест по вредному воздействию на водоемы и их обитателей [63]. Кроме того, показано, что продукты окисления фенолов (хиноны) более токсичны для водных систем, чем соответствующие полифенолы [38]. Все эти вещества могут попасть в организм вместе с пищей и оказать влияние на метаболические процессы в организме, в том числе включающие реакции с участием трипсина.

Известно, что ферментативные системы обладают чувствительностью к различным классам токсических веществ, что позволяет использовать их в качестве основы метода обнаружения загрязнителей в окружающей среде [18, 27]. Протеолитический фермент трипсин потенциально также может быть использован для оценки безопасности сред, загрязненных токсичными веществами, например, воды или пищи.

Целью работы является оценка возможности применения трипсина в качестве маркера загрязнения окружающей среды токсическими веществами разных классов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить закономерности действия тяжелых металлов, пестицидов, хинонов и консервантов на активность трипсина.
- 2) Подобрать условия проведения анализа, обеспечивающие максимальную чувствительность трипсина к выбранным классам веществ.
- 3) Разработать методику анализа загрязнения сред выбранными классами веществ.

Обзор литературы

1.1 Структура трипсина, механизм катализа и особенности функционирования

Структура и функции трипсина

Трипсин - протеолитический фермент класса гидролаз (КФ 3.4.21.4), катализирующий гидролитическое расщепление белков, пептидов, амидов и сложных эфиров по связям, в образовании которых принимают участие карбоксильные группы L-аргинина и L-лизина [82].

Впервые он был описан в конце 1800-х годов как фермент, обладающий протеолитической активностью, имеющей место в выделениях поджелудочной железы. Последующие исследования показали, что этот фермент специфически гидролизует С-концевые пептидные связи с аминокислотными остатками лизина (Lys) и аргинина (Arg) в 109 раз быстрее, чем гидролиз гидроксид-ионом. Трипсин был идентифицирован у всех животных, включая насекомых, рыб и млекопитающих. Трипсин из каждого источника может незначительно отличаться по активности, но естественным субстратом для фермента обычно является любой пептид, который содержит Lys или Arg. Специфичность трипсина позволяет ему обслуживать как пищеварительные, так и регуляторные функции. В качестве пищеварительного агента он разрушает большие полипептиды на более мелкие фрагменты. В качестве регуляторной протеазы он активирует другие белки посредством протеолиза при определенных связываниях Lys или Arg [4].

Во всех природных системах трипсин экспрессируется в неактивной форме или в форме зимогена, известного как трипсиноген. У млекопитающих трипсиноген экспрессируется в поджелудочной железе и затем секретируется в двенадцатиперстную кишку, где он активируется второй сериновой протеазой, энтеропептидазой. Энтеропептидаза распознает специфическую последовательность (Asp4-Lys) на N-конце трипсиногена и расщепляет С-конец пептидной связи с остатком Lys с образованием активного фермента, трипсина.

Сравнение кристаллических структур высокого разрешения трипсиногена и трипсина показало, что после удаления этого специфического N-концевого сегмента *заглубленный аспарат* (Asp194) вращается вокруг полипептидной цепи и образует солевой мостик с новым N-концевым амином Ile16. Это взаимодействие стабилизирует оксианионную дыру, сайт на полипептиде, который необходим для катализа. Как только эта область стабилизируется, трипсин необратимо активируется [5].

Каталитическая активность протекает за счет расположения трех аминокислот в цепях, которые составляют "каталитическую триаду".

Используя систему нумерации на основе химотрипсиногена, аминокислоты, входящие в "каталитическую триаду" обозначили следующими номерами: серин-195 (Ser195), гистидин-57 (His57) и аспарат-102 (Asp102) [5].

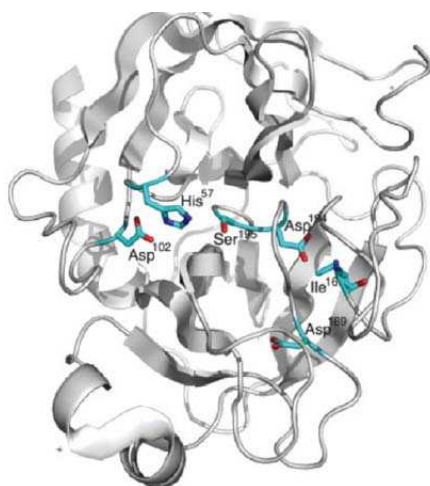


Рисунок 1 –Глобальная структура трипсина: обозначены остатки, которые образуют «каталитическую триаду» (His57, Asp102, Ser195) и основание кармана специфичности (Asp189)

Эти три аминокислоты строго консервативны среди всех членов семейства трипсинов. Некоторые признаки, выявленные с помощью кристаллографического анализа, позволяют предположить, что фундаментальные фрагменты триады не действуют независимо, а вместо этого действуют сообща для облегчения гидролиза пептидных связей.

В принятом в настоящее время механизме катализа, после образования исходного комплекса между трипсином и субстратом, гидроксильный кислород от Ser-195 атакует карбонильный углерод остатка Arg. Затем гистидин передает протон, отделенный от Ser-195, вновь образованной аминогруппе. Затем первый продукт диссоциирует и одновременно образуется ковалентный ацил-ферментный комплекс. Деацилирование происходит почти по аналогичному механизму [5].

Трипсин активен в широком диапазоне pH от 6 до 9, но оптимум каталитической активности наблюдается при pH = 7,5 - 8,5 [42].

Ингибиторы трипсина

Существует ряд естественных и синтетических ингибиторов, которые инактивируют трипсин либо обратимо, либо необратимо [42].

К числу ингибиторов, наиболее эффективно подавляющих активность трипсина, относятся фосфорорганические соединения – диизопропилфторфосфат, изопропилметилфторфосфат, диэтил-п-нитрофенилфосфат. В частности диизопропилфторфосфат, – крайне токсичное сильнодействующее соединение, - связываясь с гидроксильной группой серина в активном центре фермента, образует с трипсином прочную ковалентную связь, что приводит к полной потере активности трипсина [68,46].

К числу специфических ингибиторов трипсина относятся ингибиторы протеиназы из соевых бобов Куниц / Kunitz (KSTI) и Боуна-Бирка (BBI).

KSTI состоит из 181 аминокислотных остатков, связанных двумя дисульфидными связями. Конкурирующий ингибитор KSTI связывается с активным центром трипсина. Трипсин гидролизует пептидные связи ингибитора. После гидролиза модифицированный ингибитор удерживается в активном центре с той же конформацией из-за дисульфидной связи. Это образует стабильный комплекс фермент-ингибитор.

BBI - это относительно небольшая молекула, которая является «двуглавым» ингибитором с независимыми сайтами связывания для

химотрипсина и трипсина. Поскольку ВВІ содержит семь дисульфидных связей, этот ингибитор богат цистеином (20%). ВВІ проявляет заметную устойчивость к воздействию тепла, кислот, щелочей и протеолитических ферментов, таких как пепсин [35].

Кленбутерол (одно из широко используемых лекарственных средств, оказывающих бронхолитическое действие) ингибирует трипсин, образуя комплекс с трипсином и изменяя его конформацию [26]. Показано, что кленбутерол способен нарушать как третичную, так и вторичную структуры фермента, что приводит к значительной потере трипсином его функциональной активности.

Взаимодействие между хлорфенолом и трипсином было изучено и описано в работе [44]. Ученые выявили незначительное ингибирование трипсина (всего 10%), из чего сделали вывод, что, несмотря на связывание хлорфенола и трипсина, влияния на активность протеазы он не оказывает.

В ряде статей описаны случаи, когда связывание фермента с потенциально токсичным веществом не приводит к потере активности, а наоборот, оказывает стимулирующий эффект. В качестве примеров можно привести влияние на функции трипсина таких соединений, как изопропанол [43] и путресцин [32], которые стимулируют активность трипсина за счет изменения конформации фермента путем связывания с ним.

К стимуляторам трипсина можно отнести бензоат натрия, который также образует с трипсином комплекс [45].

Таким образом, в научной литературе преимущественно рассматривается влияние на активность трипсина лекарственных препаратов или консервантов. Работ, посвященных оценке воздействия на активность фермента загрязняющих токсических веществ (тяжелых металлов, пестицидов и др.) существенно меньше. Например, в работах [41, 10] рассмотрено взаимодействие перекиси водорода и ионов алюминия и трипсина. Кроме того, учитывая принадлежность трипсина к классу протеаз, нами было выдвинуто предположение о том, что некоторые вещества, оказывающие влияние на активность некоторых протеаз,

могут влиять и на активность трипсина. Например, в работе - [34] рассматривается влияние кадмия, содержащегося в почве, на ряд ферментов, в том числе и на протеазу.

1.2 Тяжелые металлы: биологическая функция и токсическое действие

Металлы, в том числе и тяжелые металлы, играют особую биологическую роль в метаболизме организмов. В крайне малых концентрациях они участвуют в активации ферментов, синтезе гормонов и ряде других биохимических процессов [26, 79]. Однако в бó льших концентрациях тяжелые металлы крайне опасны и наносят значительный вред организму [16, 38]. Ниже изложены биологические функции некоторых тяжелых металлов и оказываемые ими токсические эффекты.

Хлорид меди

Медь - тяжелый металл, распространенный в земной коре, в наибольшем количестве встречающийся в таких минералах, как халькопирит и борнит [12].

Медь содержится в сточных водах рудообогатительных комбинатов, металлургических, машиностроительных и электротехнических предприятий. Сульфат, карбонат, хлорокись и арсенат меди применяют как альгициды, фунгициды и моллюскоциды. Медь легко образует комплексы с неорганическими и органическими веществами, адсорбируется на взвешях. Поэтому она редко присутствует в виде свободного иона, за исключением мягких вод с повышенной кислотностью [49].

Дигидрат хлорида меди или хлорид меди двухводный $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ представляет собой сине-зеленые кристаллы с ромбической решеткой. В природе соль представлена в виде минерала эрнохальцита. Хорошо растворяется в воде, этиловом и метиловом спиртах, ацетоне, аммиаке.

В высоких концентрациях соли меди оказывают вяжущее, раздражающее и прижигающее действие на организм рыбы, а в низких — инактивируют

дыхательные ферменты. Токсичность меди возрастает при снижении жесткости воды, температуры и содержания кислорода.

Рыбохозяйственная ПДК в пресных водоемах 0,001 мг Cu/л, в морских — 0,005 мг Cu/л. Допустимые остаточные количества меди в рыбных продуктах 10 мг/кг продукта [49].

Нитрат цинка

Цинк, как простое вещество, представляет собой хрупкий переходный металл голубовато-белого цвета. В организме цинк играет важную роль: участвует в синтезе разных гормонов в организме, включая инсулин, тестостерон и гормон роста, необходим для синтеза витамина Е, необходим для расщепления алкоголя в организме, так как входит в состав алкогольдегидрогеназы [76].

Нитрат цинка — неорганическое соединение, соль металла цинка и азотной кислоты с формулой $Zn(NO_3)_2$, бесцветные кристаллы, растворяется в воде.

В воздухе рабочей зоны ПДК фосфатов и нитрата цинка 0,5 мг/м³.

При чрезвычайно высоких концентрациях цинка в организме возникают тошнота, рвота, боли в эпигастральной области, усталость. При количествах, значительно превышающих рекомендованную суточную дозировку, проявляется нарушение иммунной функции, а также оказывается неблагоприятное воздействие на соотношение липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности (ЛПНП / ЛПВП) [16].

Хлорид марганца(II)

Хлорид марганца представляет кристаллы розового цвета. Хорошо растворяется в воде. Образует кристаллогидраты.

Марганец - важнейший микроэлемент, поскольку он является необходимым компонентом для обеспечения многих физиологических функций, участвуя в регуляции целого ряда биохимических процессов в

организме. Однако биологическую значимость имеют состояния марганца с зарядом 2+, 3+ и 7+, причем 2-валентная форма более устойчивая. Суточная потребность взрослого человека в марганце составляет 2-5 мг [59]. Марганец обладает большой комплексообразующей способностью; он необходим для активации большого числа ферментов, например, декарбоксилазы пировиноградной кислоты; служит кофактором некоторых металлоэнзимов, участвующих в метаболизме кислорода и азота [79].

Несмотря на важную биологическую роль, соединения марганца являются сильными ядами с выраженным кумулятивным эффектом. Проникая через гематоэнцефалический барьер, марганец оказывает нейротоксические эффекты и вызывает сенсibilизацию организма [38].

В питьевой воде марганца должно содержаться не более 0,05 мг/л согласно СанПиН 2.1.4.1116-02.

Хлорид хрома (II)

Хром – природный элемент, присутствующий в земной коре, с валентными состояниями в диапазоне от хрома (II) до хрома (VI).

Для людей и животных хром (III) является важным питательным элементом, играющим немаловажную роль в метаболизме глюкозы, жира и белка, за счёт активации действия гормона инсулина [22]. Хром оказывает действие на процессы кроветворения. Обладает способностью активировать трипсин, так как входит в состав кристаллического трипсина в виде лабильного соединения, способного отщеплять ионы хрома. В промышленности этот тяжелый металл применяется при производстве металлической керамики, синтетических рубинов, цемента.

Основным органом-мишенью при воздействии хрома на организм человека являются легкие. Кроме этого, значительное воздействие человека на хром происходит через кожу [14].

Хлорид кобальта (II)

Хлорид кобальта представляет собой соль фиолетового цвета, хорошо растворимую в воде.

Биологическая роль кобальта очень существенна. Кобальт является составной частью важнейших металлоферментов, катализирующих процессы обмена в организмах животных и растений. Наиболее известен в этом отношении витамин В₁₂, в котором кобальт играет роль активного центра [67].

В больших концентрациях кобальт и его соединения токсичны. Вызывают одышку, действуют на желудочно-кишечный тракт, на кожу, вызывая острые дерматиты [55].

Ионы кадмия

Простое вещество кадмий при нормальных условиях - мягкий ковкий тягучий переходный металл серебристо-белого цвета. Устойчив в сухом воздухе, во влажном на его поверхности образуется плёнка оксида, препятствующая дальнейшему окислению металла.

Содержание кадмия в растениях составляет 10^{-4} % (на сухое вещество); у некоторых животных (губок, кишечнополостных, червей, иглокожих и оболочников) - 4×10^{-5} — 3×10^{-3} % сухого вещества [74].

Кадмий и все его соединения ядовиты [61]. Всасывание соединений кадмия происходит через пищевой канал, а паров - через дыхательные пути. Растворимые соединения кадмия денатурируют белки, содержащиеся в стенках пищевого канала. Поступившие в кровь ионы кадмия соединяются с сульфгидрильными группами ферментов, нарушая их функции.

Соединения кадмия накапливаются главным образом в печени и почках, а выводятся из организма в основном через почки с мочой и стенками кишок. В ряде случаев при отравлении соединениями кадмия отмечается кишечное кровотечение [62]. В питьевой воде ПДК для кадмия 0,001 мг/дм³ (СанПиН 2.1.4.1074-01).

Ионы никеля

Никель - серебристо-белый металл. Безводные соли никеля большей частью желтые, гидратированные - зеленые.

Никель является необходимым элементом для организма. Никель принимает участие в ферментативных реакциях у животных и растений. В организме взрослого человека содержится 5-13,5 мг никеля [50].

Никель обладает общетоксическим действием, а также вызывает заболевания носоглотки, легких, злокачественные новообразования, дерматиты, экземы [71].

В атмосферном воздухе ПДК (среднесуточная) для металлического никеля, его оксидов и сульфата $0,001 \text{ мг/м}^3$, для растворимых солей в виде гидроаэрозоля $0,0002 \text{ мг/м}^3$, в воздухе рабочей зоны ПДК $0,005 \text{ мг/м}^3$. Для металлического никеля ПДК в воде $0,1 \text{ мг/л}$, в почве $3,0 \text{ мг/кг}$.

Ионы мышьяка

Загрязнение окружающей среды мышьяком происходит в результате природных явлений, таких как извержения вулканов и эрозия почв. Весомый вклад также вносит антропогенная деятельность [40]. Некоторые соединения, содержащие мышьяк, используются для производства сельскохозяйственных продуктов. Такие вещества как инсектициды, гербициды, фунгициды, консерванты для древесины и красители широко применяются в сельском хозяйстве.

Токсическое действие мышьяка крайне пагубно для здоровья человека. Арсин представляет собой яд гемолитического действия, главной мишенью которого является гем. Арсениты – тиоловые яды, ингибируют ферменты. Кроме этого, они оказывают влияние на митоз, мейоз, распаривание ДНК. Арсенаты проникают в клетки по транспортным системам фосфата и конкурируют с фосфатами в процессе окислительного фосфорилирования в

митохондриях. Их действие заключается в нарушении протекания реакции образования АТФ из АДФ [31].

Ионы ртути

Простое вещество ртуть — переходный металл, при комнатной температуре представляющий собой тяжёлую серебристо-белую жидкость, пары которой чрезвычайно ядовиты, контаминант. Ртуть — один из двух химических элементов (и единственный металл), простые вещества которых при нормальных условиях находятся в жидком агрегатном состоянии.

И сама ртуть, и соединения, в которые она входит, являются крайне токсичными. Механизм токсического действия ртути связан с ее взаимодействием с сульфгидрильными группами белков. Ртуть изменяет свойства белков, инактивирует гидролитические и окислительные ферменты. Проникнув в клетку, этот тяжелый металл может включиться в структуру ДНК. Неорганические формы ртути нарушают обмен аскорбиновой кислоты, пиридоксина, меди, цинка, селена [11].

Ионы алюминия

Простое вещество алюминий — лёгкий парамагнитный металл серебристо-белого цвета, легко поддающийся формовке, литью, механической обработке.

Атом алюминия слишком тяжел и велик для включения в структурную организацию клеток, а ион слишком мал и недостаточно поляризуем, чтобы попасть в число важнейших биологических катализаторов. Высокий заряд иона Al^{3+} и склонность солей алюминия к гидролизу являются факторами, ограничивающими его роль в биохимических процессах [70]. Однако хлорид алюминия, $AlCl_3$, играет роль катализатора в реакции алкилирования бензола, в результате которой образуются его производные с алкильными боковыми цепями [56]. Алюминий входит в состав медицинских препаратов, которые

обладают обезболивающим, адсорбирующим и антацидным действием, помогая снизить кислотность желудочного сока [23].

Алюминий оказывает вредное действие на растения, начиная с концентрации 1 мг/л воды [78], поэтому использование алюминий содержащих сточных вод для орошения сельскохозяйственных культур нецелесообразно. Образуя нерастворимые соединения с фосфатами, алюминий нарушает их поглощение корнями [19]. Органами-мишенями при избыточных концентрациях алюминия в организме человека являются почки, центральная нервная система, кости, легкие, костный мозг, яичники, матка и молочные железы [81]. Алюминий тормозит усвоение кальция, магния, железа, витаминов В₆ и С и некоторых серосодержащих аминокислот [7].

1.3 Пестициды: их характеристика и действие на биологические объекты

Пестициды - химические вещества, используемые для борьбы с различными вредителями и болезнями растений. К пестицидам относятся и органические вещества (например, ДДТ, азаметиофос), и неорганические (ртуть, фтор, барий и т.д.). Однако с точки зрения цели использования пестициды классифицируют по объекту, на которого направлено действие пестицида: гербициды, фунгициды, инсектициды и т.д. [66]. Ниже изложены характеристики некоторых пестицидов органического происхождения, которые далее были выбраны в качестве исследуемых токсичных веществ.

Метрибузин

Метрибузин - избирательный гербицид, относящийся к классу триазинонов, т.е. к классу пестицидов, ингибирующих фотосинтез [2]. Данный класс отличается широким спектром действия на ряд двудольных и злаковых сорняков. Препараты данной группы обладают продолжительным эффектом, поскольку действуют как через листья, так и через почву [51].

Метрибузин сравнительно малотоксичен и не обладает раздражающим действием [72], но является умеренно токсичным для пресноводных, устьевых и морских рыб, токсичным для мелких млекопитающих [2]. Употребление метрибузина крысами приводит к смертности, снижению массы тела и увеличению массы печени. Кроме того, было обнаружено влияние на вес щитовидной железы или гистологию щитовидной железы крысы. Механизм всех этих эффектов не был объяснен [2]. Препараты на основе метрибузина относятся к 3 классу опасности для человека, к 3 и 4 классам опасности для пчёл.

Тебуконазол

Тебуконазол представляет собой бесцветные кристаллы. Хорошо растворяется в органических растворителях, плохо в воде [53]. Системный фунгицид широкого спектра действия. Обладает защитными, лечебными и искореняющими свойствами. Быстро проникает в растение и равномерно распределяется в нем [47]. Противогрибковый эффект тебуконазола обусловлен ингибированием деметилазы в грибах, блокируя таким образом биосинтез эргостерола. Недостаток эргостерола опасен для грибов, потому что он является важным компонентом стерола в мембранах грибов [39]. Кроме того, образующиеся Д5-стерины также воздействуют на метаболизм клетки, и этим тебуконазол отличается от других триазолов [53].

Тебуконазол малотоксичен для теплокровных видов. Препараты на основе тебуконазола относятся ко 2 классу опасности для человека, к 3 и 4 классам опасности для пчел [54].

Феноксапроп-П-этил

Феноксапроп-П-этил – твердое вещество белого цвета, без запаха, на свету не разрушается, но в щелочной и нейтральной средах является нестабильным. Быстро поглощаясь листьями, феноксапроп-П-этил

передвигается в базипетальном и акропетальном направлениях в различные органы растения [69].

Соединение относится к ингибиторам синтеза жирных кислот – в растениях вещество подвергается гидролизу, получается свободная кислота феноксипропа, которая в свою очередь тормозит образование жирных кислот [1]. Для дождевых червей и почвенных организмов феноксапроп-П-этил не токсичен. Вещество не проявляет токсичность по отношению к птицам и пчелам [69]. В малых концентрациях препарат не опасен для теплокровных животных [72]. Клиническая картина острого отравления препаратами, содержащими феноксапроп-П-этил, проявляется в виде снижения активности, вялости, потери равновесия, кетонурии [73].

Препараты на основе феноксапроп-П-этил относятся ко 2 и 3 классам опасности для человека, к 3 и 4 классам опасности для пчел [54].

Эпоксиконазол

Эпоксиконазол – пестицид, фунгицид широкого спектра действия из класса триазолов. Входит в состав многих препаратов. Отличается высокой эффективностью против возбудителей мучнистой росы, ржавчины, пятнистостей колоса и листьев зерновых культур.

Эпоксиконазол, как и тебуконазол, действует путем ингибирования ферментов, необходимых для грибковой клеточной мембраны [13]. По токсичности и активности для полезных животных эпоксиконазол является типичным представителем триазолов, в высоких дозах проявляет канцерогенные свойства [72].

Препараты на основе эпоксиконазола относятся ко 2 и 3 классам опасности для человека, к 3 и 4 классам опасности для пчел [54].

1.4 Хиноны: биологическая роль и токсические эффекты

Хиноны - это повсеместно распространенные биологические пигменты, встречающиеся в ряде живых организмов (бактерии, грибы, высшие растения и у немногих животных) [75]. Они существуют в природе во многих формах, таких как бензохиноны, нафтохиноны, антрахиноны и полициклические хиноны. Например, витамины К (филлохинон) представляют собой нафтохиноны. Окисление ароматических аминов, многоатомных фенолов и многоядерных углеводов приводит к образованию хинонов [15]. Убихинон или кофермент Q₁₀ является компонентом цепи переноса электронов и принимает участие в окислительном фосфорилировании.

Хиноны используются в производстве гидрохинона (фенола, используемого в производстве органических красителей [60]), в фунгицидах, в качестве аналитического реагента, в фотографии, в качестве промежуточного химического вещества и в качестве окислителя. Различные типы хинонов вырабатываются в организме естественным путем или после воздействия различных ксенобиотиков. В качестве исследуемых веществ нами были выбраны 1,4-бензохинон, как представитель самых простых хинонов, и толухинон, производное 1,4-бензохинона.

1,4-Бензохинон - органическое соединение, представитель класса хинонов, один из двух известных изомеров бензохинона. Представляет собой золотисто-жёлтые кристаллы с резким запахом. При попадании в организм вызывает превращение гемоглобина в метгемоглобин, что приводит к анемии [60].

Токсические эффекты обусловлены физическим взаимодействием самого хинона с клетками центральной нервной системы (ЦНС). Проглатывание хинона приводит к рвоте, одышке, аноксии и дыхательной недостаточности [15]. Толухинон, являясь производным бензохинона, метил-1,4-бензохинон, имеет такое же токсическое действие.

Желудочно-кишечный тракт является основным местом поглощения хинонов. Они частично выводятся из организма в неизмененном виде, но основная масса удаляется при конъюгации с гексуроновой кислотой, серной кислотой и другими кислотами [15]. В организме происходит полное восстановление хинона до соответствующего гидрохинона или катехина соответственно.

1.5 Характеристика отдельных консервантов

Консерванты — вещества, останавливающие рост микроорганизмов в продуктах питания. Пищевые консерванты используются, чтобы избежать порчи при хранении, распространении, продаже и потреблении. Это соединения, которые намеренно добавляют в пищевую продукцию, чтобы избежать неблагоприятных реакций и, таким образом, защитить качество и продлить срок хранения продуктов и напитков. Консерванты используются в контролируемых количествах и обычно на низких уровнях: 1 – 3% от веса продукта [20]. Однако при использовании некоторых консервантов в чистом виде зафиксировано пагубное воздействие на организм [29]. Исследователи в данной работе [21] определили непосредственный токсический эффект ряда консервантов, используя серию биотестов.

Бензоат натрия и сорбат калия являются одними из популярных консервантов, которые используются для консервации продуктов питания. Поэтому, попадая в организм непосредственно с пищей, они могут взаимодействовать с трипсином.

Бензоат натрия

Бензоат натрия - натриевая соль бензойной кислоты, пищевая добавка, относится к консервантам (E211).

Механизм действия заключается в абсорбции бензойной кислоты в клетку. Если внутриклеточный pH падает до 5 или ниже, анаэробная

ферментация глюкозы через фосфофруктокиназу резко снижается [28], что подавляет рост и выживание микроорганизмов, вызывающих порчу пищи. Бензоат натрия используется для лечения нарушений цикла мочевины из-за его способности связывать аминокислоты [24].

Сорбат калия

Сорбат калия - калиевая соль сорбиновой кислоты, получаемая методом нейтрализации сорбиновой кислоты гидроксидом калия. Широко применяется в качестве консерванта (E202) в пищевых продуктах. В отличие от сорбиновой кислоты, хорошо растворяется в воде.

Сорбат калия используется для подавления образования плесени и дрожжей во многих продуктах, таких как сыр, вино, йогурт, сушеное мясо, яблочный сидр, регидратированные фрукты, безалкогольные и фруктовые напитки, а также выпечка [30]. Некоторые плесени и дрожжи способны детоксифицировать сорбаты путем декарбоксилирования.

В чистом виде сорбат калия является раздражителем кожи, глаз и дыхательных путей. Концентрации до 0,5% (в качестве пищевой добавки сорбат калия используется в качестве консерванта в концентрациях от 0,025% до 0,1%) не являются значительными раздражителями кожи [29]. Максимально допустимое суточное потребление для человека составляет 25 мг / кг или 1750 мг в день для среднего взрослого (70 кг) [8].

1.6 Принципы, преимущества и недостатки методов ферментативного тестирования

Ферментативные методы анализа основаны на использовании химических реакций с участием ферментов. Все ферментативные методы можно разделить на две группы: селективные методы анализа и интегральные тесты.

В медицине используются главным образом селективные методы. В этом случае определяемым компонентом в ферментативных методах являются

субстраты, непосредственно сами ферменты, коферменты и эффекторы. О содержании определяемого компонента судят либо по количеству конечного продукта ферментативной реакции, либо по скорости процесса, положенного в основу методики определения [57]. Для наблюдения за скоростью ферментативной реакции применяют обычно люминесцентные, электрохимические или спектрофотометрические методы.

Высокая селективность ферментативных методов анализа обусловлена образованием фермент-субстратного комплекса в процессе каталитического акта, требующим структурного соответствия активного центра фермента и субстрата. Поэтому большинство ферментов активно в реакциях только с субстратом одного определенного типа или с группой субстратов, имеющих общие структурные группы.

В последнее время ферментативные методы активно используются при контроле загрязнений окружающей среды. Предпосылками для использования ферментов в качестве биотестов послужила их высокая чувствительность к воздействию токсических веществ. Например, было показано, что некоторые ионы солей тяжелых металлов (Ag^+ , Hg^+ , Pb^{2+}) ингибируют активность почти всех ферментов. Действие их состоит во взаимодействии с металлами, входящими в состав ферментов. Кроме того, соли тяжелых металлов даже в малых концентрациях влияют на активность ферментов, связывая аминок-, сульфгидрильные и другие группы ферментов [77, 52], хотя денатурация белков при этом происходит не всегда.

Было исследовано изменение активности ряда пищеварительных ферментов (амилаза, трипсин) у рыб в присутствии оловоорганических соединений [48], показано, что хлорорганические и фосфорорганические пестициды вызывают изменения активности трансаминаз и холинэстеразы [65]. Для мониторинга загрязнения водоемов тяжелыми металлами использовали такие биохимические тесты как изменение активности фосфатазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у личинок дафний и хирономид [80]. Чувствительным тестом на диоксин-подобные вещества является изменение активности

печеночной 7-этоксидеэтилазы культивируемых куриных эмбрионов [6]. Разработаны и применяются ферментативные методы определения пестицидов, фенолов, аминов, ионов тяжелых металлов в природных и сточных водах [64]. Для разработки биосенсоров для обнаружения карбаматов и органофосфатов активно используется фермент ацетилхолинэстераза (AChEs) [78].

Поскольку ферменты различных классов обладают чувствительностью к разным группам потенциально токсичных веществ, ферментативные реакции являются перспективной основой для разработки на их основе методик анализа безопасности сред и экспрессного обнаружения загрязнения. Протеолитический фермент трипсин потенциально также может быть использован для оценки безопасности сред, загрязненных токсичными веществами, например, воды или пищи. Оценка возможности применения трипсина в качестве маркера загрязнения окружающей среды токсическими веществами была предметом исследования в данной работе.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Материалы и оборудование, используемые в работе

В работе использовали трипсин («Sigma», Германия, 1300 BAEE U/мг), специфичный субстрат -N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир (БАЭЭ) производства «Sigma», Германия.

В качестве растворителей использовали азотную кислоту ("Технологическая лаборатория Гиредмет", "Химреактивснаб", г. Уфа), ацетонитрил (АО «Экос-1», Россия) и дистиллированную воду.

В качестве исследуемых тяжелых металлов использовали водные растворы солей марки «чда»: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 .

Ионы исследуемых металлов (кадмия, никеля, мышьяка, ртути и алюминия), представленных в виде ампул государственных стандартных образцов ионов металлов, разведенных в азотной кислоте (ОАО «Уральский завод химических реактивов», Россия), разводили в дистиллированной воде.

Стандартные препараты пестицидов (метрибузин, тебуконазол, феноксапроп-П-этил, метрибузин), представленных в виде государственных стандартных образцов, разводили в ацетонитриле.

Препараты 1,4-бензохинона, толухинона («Sigma», Германия), бензоата натрия («Sigma», Нидерланды) и сорбата калия («Supelco», США) разводили в дистиллированной воде.

2.2 Методика определения активности трипсина

Принцип метода определения активности трипсина заключается в измерении скорости гидролиза БАЭЭ (α -N-бензоил-L-аргинин этиловый эфир) трипсином путем регистрации изменений оптической плотности исследуемой пробы во времени.

Буфер по Кларку-Лабсу pH 7,6 0,1 М готовили следующим образом. Навеску 3,4 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) заливали 250 мл дистиллированной воды. Навеску 0,848 г гидроксида натрия (NaOH) заливали 212 мл дистиллированной воды. Полученные растворы смешивали.

0,5 мМ раствор БАЭЭ получали путем растворения 0,008571 г БАЭЭ в 50 мл буфера и хранили при 4 °С в течение месяца.

Для приготовления раствора трипсина брали навеску 0,00425 г трипсина и заливали 5 мл холодного (2-8 °С) 1мМ раствора HCl , приготовленного путем добавления к 16,6 мл дистиллированной воды 37% раствора HCl .

При проведении анализа реакционная смесь содержала следующие компоненты: 40 мкл 1 мМ соляной кислоты, 450 мкл исследуемой или контрольной пробы, 40 мкл буфера по Кларку-Лабсу pH 7,6 0,1 М, 460 мкл субстрата БАЭЭ 0,5 мМ и 10 мкл трипсина.

Измерение оптической плотности проводили в течение 3-х минут при длине волны 253 нм с использованием спектрофотометра Uvikon 943 («Control Instrument», Италия).

Скорость реакции определяли по скорости ферментативного гидролиза БАЭЭ трипсином по формуле:

$$—,$$

где ΔD - изменение оптической плотности реакционной смеси, Δt - время проведения измерения в минутах.

Далее в работе под термином «активность трипсина» будет подразумеваться скорость ферментативного гидролиза БАЭЭ.

Критерием воздействия исследуемой пробы на активность фермента считали ингибирование скорости гидролиза БАЭЭ в присутствии токсикантов на 20% и более по сравнению с активностью фермента в контрольной пробе. На основании полученных данных определяли величины токсикологических параметров IC_{20} и IC_{50} , соответствующие концентрациям токсикантов, вызывающим ингибирование системы на 20% и 50% соответственно.

Изъято с 26 по 38 стр.

Выводы

1. Определена чувствительность трипсина к тяжелым металлам, пестицидам, хинонам и консервантам. Ингибирующий эффект на активность трипсина увеличивается в ряду $As < Ni < \text{толухинон} < \text{метрибузин} < \text{феноксапроп-П-этил} < Cu < 1,4\text{-бензохинон} < \text{сорбат калия}$. В присутствии марганца и хрома наблюдается стимулирующий эффект: активность трипсина увеличивается на 38%.

2. Модификация методики анализа путем введения дополнительной процедуры инкубации фермента в анализируемом растворе токсиканта и уменьшения количества трипсина до 5,53 mU позволило увеличить чувствительность метода к действию марганца, меди, хрома, никеля, мышьяка, пестицидов метрибузина и феноксопроп-П-этила, бензо- и толухинона.

3. Разработанная методика имеет ряд ограничений, что осложняет использование трипсина в качестве маркера для обнаружения в окружающей среде большинства исследованных веществ.

Заключение

Показано, что ферментативный метод на основе трипсина имеет существенные ограничения, что осложняет анализ токсичности сред, имеющих в составе исследуемые вещества.

Такие загрязнители как хлорид кобальта, нитрат цинка, ионы кадмия, ртути и алюминия, тебуконазол и эпоксиконазол при заданных концентрациях влияния на активность трипсина не оказали.

Были подобраны условия проведения анализа, обеспечивающие максимальную чувствительность трипсина к выбранным классам веществ. Введение дополнительных процедур (инкубации и уменьшении количества трипсина до 5,53 мU) позволило увеличить чувствительность метода. Хлорид меди, ионы никеля и мышьяка, метрибузин и феноксапроп-П-этил, 1,4-бензохинон и толухинон, сорбат калия оказали ингибирующее действие на трипсин. Хлориды марганца и хрома, бензоат натрия оказали стимулирующее действие. Наибольший ингибирующий эффект был зафиксирован при добавлении в реакционную смесь сорбата калия - 46%. Наибольший стимулирующий эффект был зафиксирован в присутствии хлорида марганца - 38%.

Несмотря на отсутствие чувствительности фермента к отдельным тяжелым металлам и пестицидам исследование освещает влияние на активность трипсина таких загрязнителей, которые ранее не рассматривались в качестве возможных ингибиторов и стимуляторов фермента, решая тем самым фундаментальную задачу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Albuquerque, N.C.P. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review / N.C.P. Albuquerque, D.B. Carrão, M.D. Habenschus, A.R.M. de Oliveira // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.– 2018. – Volume 147. – P. 89-109.
2. Armendáriz, C.R. Metribuzin / C.R.Armendáriz, A.H.dea Torre, Á.J.G. Fernández, G.L.González // Encyclopedia of Toxicology. –Third Edition. – 2014. – P. 327-329.
3. Arora, M. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources / M. Arora, B. Kiran, Sh. Rani, A. Rani, B. Kaur, N. Mittal // Food Chemistry. – 2008. – T. 111. – № 4. – C. 811-815.
4. Baird, Jr.T.T. Conversion of trypsin to a functional threonine protease /Jr.T.T. Baird, Wright W.D., C.S. Craik // Protein Science. – 2006. –№15. – P. 1229–1238.
5. Baird, Jr.T.T. Trypsin 2013 / TT.Jr. Baird // San Francisco State University. Elsevier Inc.–2013.
6. Brunstrom, B. Erodinduction in cultured chick embryo liver: a sensitive bioassay for dioxin-like environmental pollutants / Brunstrom B., Engwall M., Hjelm K., Lindqvist L., Zebuhr Y. // Environ. Toxicol, and Chem. – 1995. – V. 14, N 5. – P. 837–842.
7. Cannata, B. Aluminum toxicity: Its relationship with bone and iron metabolism / J. Andia, B. Cannata // Nephrol. Dial. Transplantation. —1996. — vol.11. — Suppl. 3. — P. 69-73.
8. Carocho, M. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives / M. Carocho, M.F. Barreiro, P. Morales, I.C.F.R. Ferreira // Food Science and Food Safety. — 2014. —13 (4). — P. 377–399.
9. Chang, C.Y. Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China / C.Y. Chang, H.Y. Yu, J.J. Chen, F.B. Li, H.H. Zhang, C.P. Liu // Environmental Monitoring and Assessment. – 2014. – T. 183. – № 3. – C. 1547–1560.

10. Chanphai, P. Aggregation of trypsin and trypsin inhibitor by Al cation / P. Chanphai, L. Kreplak, H.A. Tajmir-Riahi // *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. – 2017. – №169. – P. 7–12.
11. Clarkson, T.W. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations / T.W. Clarkson, L. Magos, G.J. Myers // *New Engl. J. Med.* – 2003. – №349. – с.1731-1737.
12. Copper 2017 [Электронный ресурс] // Royal Society of Chemistry - Periodic table. – 2017. – Режим доступа: <http://www.rsc.org/periodic-table/element/29/copper>)
13. Correia, M. Fungicides / M. Correia, M. Rodrigues, P. Paíga, C. Delerue-Matos // *Encyclopedia of Food and Health*. – 2016. – P. 169-176.
14. Costa, M. Toxicity and carcinogenicity of Cr (VI) in animal models and humans 1997 [Электронный ресурс] / *Critical Reviews in Toxicology*. – 1997 – № 27. – С.431-442. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347224>.
15. Devi, S.S. Quinone / S.S. Devi, H.M. Mehendale // *Encyclopedia of Toxicology*. —2014. — Third Edition. — P. 26-28.
16. Dourado, P.L.R. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays / P.L.R. Dourado, M.P. Rocha, L.M. Roveda, J.L. Raposo, J.L.S. Cândido, C.A.L. Cardoso, M.A.M. Morales, K.M.P. Oliveira, A.B. Grisolia // *Genet Mol Biol*. — 2017. — V. 40. — I. 1. — С. 122-123.
17. Esimbekova, E. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. Esimbekova, A. Kondik, V. Kratasyuk // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2013. –V. 185, Issue 7. – P. 5909-5916.
18. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2013. – T. 185. – № 7. – С. 5909–5916.
19. Fleming, A.L. Root structure reflects differential aluminum tolerance in wheat varieties / A.L. Fleming, C.D. Foy // *Agron. J.*. — 1968. — vol.60. — P.172.

20. García-García, R. Preservatives: Food Use / R. García-García, S.S. Searle // Encyclopedia of Food and Health. – 2016. – P.505.
21. Gong, Z. Acetylcholinesterase biosensor for carbaryl detection based on interdigitated array microelectrodes / Z. Gong, Y. Guo, X. Sun, Y. Cao, X. Wang // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2014. – T. 37. – № 10. – C. 1929–34.
22. Goyer, RA. Toxic effects of metals 2001 [Электронный ресурс] // Toxicology: The Basic Science of Poisons. – New York: McGraw-Hill Publisher – 2001. – C. 811 – 867. – Режим доступа: <http://www.sci epub.com/reference/67598>.
23. Gupta, P.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants // Adv. Drug. Deliv. Rev. — 1998. — n.32. — P.155.
24. Häberle, J. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders / J. Häberle, N. Boddaert, A. Burlina, A. Chakrapani, M. Dixon, M. Huemer, D. Karall, D. Martinelli, P. S. Crespo, R. Santer, A. Servais, V. Valayannopoulos, M. Lindner, V. Rubio, C. Dionisi-Vici // Orphanet Journal of Rare Diseases. — 2012. — 7. — P. 32.
25. Jallow, M.F.A. Monitoring of Pesticide Residues in Commonly Used Fruits and Vegetables in Kuwait / M.F.A. Jallow, D.G. Awadh, M.S. Albaho, V.Y. Devi, A. Nisar // Int. J. Environ Res. Public Health. –2017. – Aug; 14(8). – P. 833.
26. Jun Chai, Investigation on potential enzyme toxicity of clenbuterol to trypsin 2013 / Jun Chai, Qifei Xu, Jinping Dai, Rutao Liu // Spectrochimica Acta. – 2013. – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. –№105. – P. 200–206.
27. Kratasyuk, V. A. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – T. 18. – № 10. – C. 952–959.
28. Krebs, H. A. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate / H. A. Krebs, D. Wiggins, M. Stubbs, A. Sols, F. Bedoya // Biochem. J. —198. — 3. — P.657–663.

29. Liebert, M.A. Final Report on the Safety Assessment of Sorbic Acid and Potassium Sorbate // Journal of the American College of Toxicology. — Volume 7, Number 6. — 1988. — P. 837 - 880.
30. Lück, E. Sorbic Acid / E. Lück, M. Jager, N. Raczek // Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. — 2000.
31. MO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Report of the seventeenth session 1987 [Электронный ресурс] / World Health Organization // Reports and Studies. — 1987. — №31. — Режим доступа: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/62800>.
32. Momeni, L. A spectroscopic and thermal stability study on the interaction between putrescine and bovine trypsin / L. Momeni, B. Shareghi, A.A. Sabouryc, S. Farhadian, F. Reisi // International Journal of Biological Macromolecules. —2017. —№94. — P. 145–153.
33. Nagajyoti, P. C. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review / P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, T. V. M. Sreekanth // Environmental Chemistry Letters. — 2010. — № 8. — С. 199–216.
34. Renella, G. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils / G. Renella, M. Mench, D. van der Lelie, G. Pietramellara, J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, P. Nannipieri // Soil Biology & Biochemistry. —2004. —№36.—P. 443–451.
35. Savage, G.P. Trypsin Inhibitors 2003 / G.P.Savage, S.C.Morrison // Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. — 2003. —Second Edition. —P. 5878-5884.
36. Schreinemachers, P. Too much to handle? Pesticide dependence of smallholder vegetable farmers in Southeast Asia / P. Schreinemachers, H.Chen, T.T.L. Nguyen, B. Buntong, L. Bouapao, S. Gautam, N.T. Le, T. Pinn, P. Vilaysone, R. Srinivasan // Science of The Total Environment. — 2017. —Volumes 593–594. — P. 470-477.

37. Shimada, H. Acute, nontoxic cadmium exposure inhibits pancreatic protease activities in the mouse 2000 /H.Shimada, T.Funakoshi, MP. Waalkes//Toxicol Science. – 2000.–2. – P.474-80.
38. Stom, D.I. Influence of polyphenols and quinones on aquatic plants and their blocking of SH-groups // Actahydrochim. hydrobiol. —1977. — V. 5. — P. 291 - 298.
39. Tasheva, M. Pesticide Residues: Conazoles // Encyclopedia of Food Safety. — 2014. — Volume 3. — P. 1-4.
40. Toxicological Profile for Arsenic 2015 [Электронный ресурс] / Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) // Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. – 2015. – Режим доступа: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3>.
41. Wei Song, Dissection of the binding of hydrogen peroxide to trypsin using spectroscopic methods and molecular modeling / Wei Song, Zehua Yu, Xinxin Hu, Rutao Liu // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. –№137. – P. 286–293.
42. Williams, J.A. Trypsin // Encyclopedia of Gastroenterology.–2004. – P. 533-534.
43. Xinxin Hu, Spectroscopic investigations on the interactions between isopropanol and trypsin at molecular level / Xinxin Hu, Zehua Yu, Rutao Liu // Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.– 2013. –№108. – P.50–54.
44. Yan Qing Wang, In vitro and in silico investigations of the binding interactions between chlorophenols and trypsin / Yan-Qing Wang, Chun-Yun Tan, Shu-Lin Zhuang, Peng-Zhan Zhai, Yun Cui, Qiu-Hua Zhou, Hong-Mei Zhang, Zhenghao Fei // Journal of Hazardous Materials. – 2014. –Volume 278. – P. 55-65.
45. Yue Mu, Interaction of sodium benzoate with trypsin by spectroscopic techniques / Yue Mu, Jing Lin, Rutao Liu // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. –2011. – P. 130– 135.
46. Алейникова, Т.Л. Биохимия [учеб. для вузов] / Т.Л. Алейникова, под редакцией Е.С. Северина // ГЭОТАР-Медиа. – 2003. – С. 779.

47. Белов, Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении: Учебное пособие для студентов // М.: МГУЛ. — 2003. — С. 128.
48. Бузинова, Н.С. Патологические изменения активности пищеварительных ферментов рыб // Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. — М.: Наука, 1983. — С. 131–137.
49. Васильков, Г.В. Болезни рыб: Справочник / Г.В. Васильков, Л.И. Грищенко, В.Г. Енгашев и др.; Под ред. В. С. Осетрова // Москва. —1989.
50. Войнар, А. И. Биологическая роль микроэлементов и их применение в сельском хозяйстве и медицине / А. И. Войнар // 1970. —т. 1—2Л.
51. Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков // М.: КолосС. — 2006. — С. 248.56
52. Голованова, И.Л. Влияние тяжелых металлов на физиолого-биохимический статус рыб и водных беспозвоночных // Биология внутренних вод. — 2008. — № 1. — С. 99–108.
53. Голышин, Н. М. Фунгициды // М.: Колос. — 1993. — С. 319.
54. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации // О Министерстве сельского хозяйства Российской Федерации : постановление Правительства Российской Федерации от 12.06.2008 №34. — Ред. от 15.01.2015.
55. Грушко, Я.М. Вредные неорганические соединения в промышленных выбросах в атмосферу / Я.М. Грушко // Л.: Химия. — 1987. — С. 69.
56. Дикерсон, Р. Основные законы химии: В 2-х томах / Р. Дикерсон, Г. Грей, Дж. Хейт // М.: Мир. — 1982. — Т.2. — С. 305.50
57. Долманова, И. Ф. Журнал аналитической химии / И. Ф. Долманова, Н.Н. Угарова // 1980. —т. 35, в. 8. — С. 1597-1639.
58. Есимбекова, Е.Н. Стабилизация бутирилхолинэстеразы методом включения в гели на основе природных полимеров / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, В.И. Лоншакова-Мукина // Издательство «Наука». - 2018. - №4. - с. 460-463.

59. Иванова, Т.М. Биологическая роль и токсические эффекты марганца / Т.М. Иванова, Е.В. Семенов, К.В. Сизова, А.С. Иванова, Н.Л. Елаева, Г.В. Шестова // Спб.: ЭЛБИ-Спб. – 2010. – С. 115 - 121.
60. Карпова, Н.Б. Бензохиноны : статья // М. : Советская энциклопедия. – 1988. — Т. 1. — С. 278—279.
61. Ковальский, В.В. Кадмий // В.В. Ковальский, Р.С. Воробьева, А.Ф. Рубцов, Большая медицинская энциклопедия : в 30 т. / гл. ред. Б.В. Петровский. — 3 изд. — Москва : Советская энциклопедия, 1979. — Т. 10. Кабаков - Коалесценция. — С.528.
62. Крамаренко, В.Ф. Токсикологическая химия / В.Ф. Крамаренко // Киев: Вища школа, Головное изд-во. –1989. – с.306 - 309.
63. Кудряшова, Н.С. Закономерности ингибирования бактериальной люминесценции *in vitro* хинонами и фенолами - компонентами сточных вод / Н.С. Кудряшова, Е.В. Шалаева, Е.Н. Задорожная, В.А. Кратасюк, А.Э. Балаян, Д.И. Стом // Т.39. — 1994. — В. 3. — С. 455.
64. Кулис, Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов / Ю.Ю. Кулис // Вильнюс: Изд-во Мокслас. –1981. – С. 200.
65. Маляревская, А.Я. Специфические и неспецифические изменения при действии различных токсикантов как показатели патологического состояния организма рыб // Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. – М.: Наука, 1983. – С. 99–105.
66. Мартыненко, В.И. Пестициды: Справочник / В.И. Мартыненко, В.К. Промоненков, С.С. Кукаленко С.Д. Володкович, В.А. Каспаров // М. : Агропромиздат. – 1992. – С.368.
67. Мартыненко, Л.И. Избранные главы неорганической химии / Л.И. Мартыненко, В.И. Спицын // М.: Изд-во Моск. ун-та. — 1988. — В.2: Учеб. пособие. — С.136.
68. Мосолов, В.В. Протеолитические ферменты / В.В. Мосолов // М., «Наука» – 1971. – С. 404.

69. Новожилов, К.В. Средства защиты растений / К.В. Новожилов, В.И. Долженко // М.. — 2011. — С. 244.
70. Оленин, С.С. Неорганическая химия: Учеб. пособие для студентов вузов / С.С. Оленин, Г.Н. Фадеев // М.: Высш. школа. — 1979. — С. 181.
71. Перельман, Ф. М. Кобальт и никель / Ф. М. Перельман, А.Я. Зворыкин // Наука. —1975.
72. Попов, С.Я. Основы химической защиты растений / С.Я. Попов, Л.А. Дорожкина, В.А. Калинин // М.: Арт-Лион. — 2003. — С. 208.
73. Ракитский, В.Н. Справочник по пестицидам (токсиколого-гигиеническая характеристика) // М.: Издательство Агрорус. — 2011. — Выпуск 1.— С.960.
74. Реми, Г. Курс неорганической химии / пер. с нем.канд. хим. наук А.И. Григорьева, канд. хим. наук А.Г. Рыкова, Н.С. Смирновой, канд. хим. наук Н.Я. Туровой под ред. чл.-корр. АН СССР А.В. Новоселовой // Мир. —1966. — Т.2. —С. 476—486.
75. Реутов, О.А. Органическая химия. В 4-х частях / О.А. Реутов, А.Л. Курц, К.П. Бутин // М. БИНОМ. Лаборатория знаний. —2004. — Ч.3. — С. 544.
76. Скальный, А.В. Цинк и здоровье человека // РИК ГОУ ОГУ. — 2003.
77. Сорвачев, К.Ф. Норма и патология на молекулярном уровне // Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология. — М.: Наука, 1983. — С. 121–131.
78. Сынзыныс, Б. И. О фито- и генотоксичности алюминия / Б. И. Сынзыныс, Н. В. Буланова, Г. В. Козьмин // С.-х. биология. 2002. - № 1. -С. 104-109.
79. Трахтенберг, И.М. Тяжелые металлы и клеточные мембраны (обзор литературы) / И.М. Трахтенберг, Л.А. Иванова // Медицина труда. — 1999. — № 11. — С. 28-32.
80. Цветков, И.Л. Кислая фосфатаза гидробионтов как фермент-индикатор биохимической адаптации к воздействию токсических веществ / И.Л. Цветков, С.Л. Зарубин, Г.А. Урванцева [и др.] // Изв. АН РАН. Сер. «Биология». — 1997. — № 5. — С. 539–545.

81. Шугалей, И. В. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы / И. В. Шугалей, А.В. Гарабаджиу, М.А. Илюшин, А.М. Судариков // Экологическая химия. — 2012. — 21 (3). — С. 172 - 186.54
82. Энциклопедический словарь медицинских терминов. — М.: Советская энциклопедия . — 1982 — 1984 гг.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой



« 24 » июня 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Оценка действия отдельных классов токсических веществ на
активность трипсина

03.03.02. – Физика

Руководитель


24.06.19

к.б.н., доцент, с.н.с. Е.Н., Есимбекова

Выпускник


14.06.19

А.А., Анташкевич

Красноярск 2019